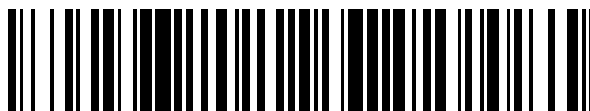


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 545**

51 Int. Cl.:

C07K 5/10 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

A61K 8/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2012 E 12708556 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 2670766**

54 Título: **Nuevos péptidos que intervienen en la vía de señalización de SCF c-Kit y composiciones que los comprenden**

30 Prioridad:

01.02.2011 FR 1100299

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

27.03.2015

73 Titular/es:

**ISP INVESTMENTS INC. (100.0%)
1011 Centre Road, Suite 315
Wilmington, DE 19805, US**

72 Inventor/es:

**DAL FARRA, CLAUDE;
DOMLOGE, NOUHA y
BOTTO, JEAN-MARIE**

74 Agente/Representante:

URÍZAR ANASAGASTI, José Antonio

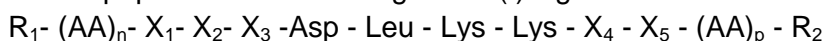
ES 2 532 545 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nuevos péptidos que intervienen en la vía de señalización SCF c-Kit y composiciones que los comprenden.

5 [0001] La presente invención se sitúa en los dominios de la cosmética y la farmacia. Se refiere a compuestos peptídicos de fórmula general (I) siguiente:



10 en tanto que compuesto que tiene una acción sobre la vía de señalización SCF/c-Kit, así como sus usos en composiciones cosméticas y/o farmacéuticas para atenuar defectos de pigmentación de la piel.

15 [0002] En los seres humanos, el color del pelo y la piel se relaciona con factores individuales (etnia, género, edad, etc.) y factores ambientales (principalmente las estaciones del año, el área de vivienda, etc.). Se determina principalmente por la naturaleza y la concentración de melanina producida por los melanocitos. Los melanocitos son grandes células dendríticas localizadas en la capa basal de la epidermis. Estas células especializadas sintetizan melanina a través de orgánulos específicos, los melanosomas. La síntesis de la melanina, o melanogénesis, es un proceso complejo en el que todavía no se conocen los mecanismos
20 precisos y esquemáticamente implica los siguientes pasos:



25 [0003] Esta melanina juega un papel fundamental en la determinación del color de la piel. A menudo hablamos de unidades epidérmicas (o elementales) de melanización que corresponden de hecho a conjuntos funcionales donde los melanocitos están en contacto con una serie de queratinocitos vecinos, a los que transfieren los granos de pigmento. El número de unidades varía según la región del cuerpo. Esas unidades contienen en promedio 1 melanocito por cada 36 queratinocitos (aunque hay variaciones). La transferencia de pigmento de
30 melanocito a los queratinocitos se realiza en 4 fases principales:

- 1: síntesis de los melanosomas en el melanocito;
- 2: melanización de los melanosomas en el melanocito;
- 3: transferencia de los melanosomas a los queratinocitos;
- 35 - 4: degradación y eliminación de los melanosomas en los queratinocitos.

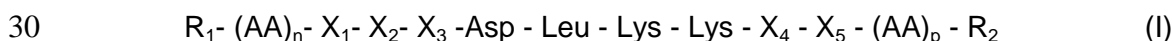
40 [0004] A medida que la melanina se sintetiza en los melanosomas, éstos se desplazan de la región perinuclear hacia la extremidad de las dendritas de los melanocitos. Por fagocitosis, la extremidad de las dendritas es capturada por los queratinocitos, se degradan las membranas y se redistribuyen los melanosomas en los queratinocitos. Una vez en los queratinocitos, los melanosomas se reparten según su tamaño: aislamiento para los más grandes, en paquetes para los más pequeños (Ortonne, et al 1981). Se degradan secundariamente en las vacuolas lisosomales (Fitzpatrick et al. 1979).

[0005] La transferencia de los melanosomas hacia los queratinocitos, como se describió anteriormente, se consigue por medio de muchos procesos biológicos, enzimáticos, y, hasta la fecha, no ha sido completamente aclarada. Uno de los actores en ese proceso de transferencia de melanosomas es la proteína SCF y su receptor c-Kit. La proteína SCF (factor de células madre) es el ligando agonista natural del receptor c-Kit que es un miembro de la subfamilia III de la superfamilia de receptores tirosina quinasa (RTK). Se ha demostrado en numerosas publicaciones que esta vía de señalización SCF/c-Kit juega un papel clave en muchos procesos biológicos, y en particular en la hematopoyesis, en la espermatogénesis, pero también en el mantenimiento de una homeostasis de la piel y en la pigmentación de ésta (Longley J. et al, J Invest Dermatol 1999; 113: 139-140).

[0006] Se sabe que anomalías en la transferencia de melanosomas hacia los queratinocitos pueden conducir a problemas pigmentarios, sean de naturaleza hiperpigmentaria o de naturaleza hipopigmentaria. En particular, algunos estudios han demostrado que la vía de señalización SCF/c-Kit podría regular a la vez la proliferación y la diferenciación de los melanocitos. La proteína SCF en la superficie de los queratinocitos epidérmicos podría permitir una regulación de los melanocitos adyacentes, a través de una interacción directa con el receptor c-Kit situado en dicho melanocitos. Además, se ha probado que algunos factores de transcripción cruciales para la síntesis de la melanina se activaban a través de la vía SCF/c-Kit (Grichnik, JM et al J Invest Dermatol 1998; 111: 233-238..). Por lo tanto, podemos pensar que la vía SCF/c-Kit es importante para la función normal de los melanocitos, y que es posible que alteraciones en esta vía de señalización sean responsables de algunos trastornos melanocíticos, es decir, pigmentarios.

[0007] JP-A-20080031094 describe un inhibidor de la SCF de origen vegetal.

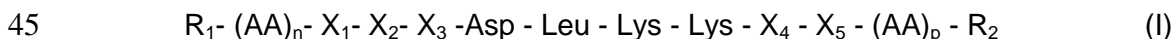
[0008] Es siguiendo esta línea de investigación que el solicitante ha demostrado que los compuestos peptídicos de fórmula general (I) siguiente:



eran agentes que permiten influir en la pigmentación de la piel y de los tegumentos, asegurando una transferencia óptima de los melanosomas a los queratinocitos, para uniformizar el tono de la piel gracias a un efecto sobre la vía de señalización de SCF/c-Kit. Los compuestos peptídicos según la invención se caracterizan por el hecho de que:

- protegen las estructuras pigmentarias la piel frente a agresiones externas;
- permiten atenuar las deficiencias de la pigmentación relacionadas con la edad y los efectos del fotoenvejecimiento sobre la piel; y
- permiten tratar las irregularidades del tono y unificar el tono.

[0009] La presente invención tiene pues por primer objeto un compuesto peptídico de fórmula general (I) siguiente:

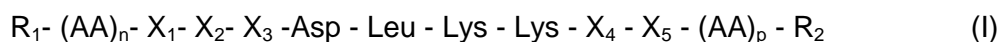


[0010] La presente invención tiene por segundo objeto una composición cosmética que comprende, a título de principio activo, dicha composición peptídica de fórmula (I).

5 [0011] Además, la presente invención tiene por tercer objeto la utilización de una composición cosmética que comprende dicho compuesto péptido de fórmula (I) para (i) proteger las estructuras pigmentarias la piel frente a agresiones externas, (ii) reducir los defectos de pigmentación relacionados con la edad y los efectos del fotoenvejecimiento en la piel, y (iii) tratar las irregularidades del tono y unificar el tono.

10 [0012] Finalmente, la presente invención tiene por cuarto objeto un método de tratamiento cosmético de la piel o de tegumentos a tratar con ayuda de la composición que comprende dicho compuesto péptido de fórmula (I).

15 [0013] El primer objeto de la presente invención se refiere a un compuesto peptídico de fórmula general (I):



20 en la cual,

X_1 representa una asparagina, una serina, una glutamina o cualquier aminoácido,

X_2 representa una serina, una treonina, una cisteína o cualquier aminoácido,

X_3 representa una arginina, una lisina, una histidina o cualquier aminoácido,

X_4 representa una serina, una tirosina, una treonina o cualquier aminoácido,

25 X_5 representa una fenilalanina, una prolina, una alanina, una valina o cualquier aminoácido,

AA representa un aminoácido cualquiera, y n y p son números enteros entre 0 y 2,

30 R_1 representa la función amina primaria del aminoácido N-terminal, $-NH_2$, en la que uno de los dos átomos de hidrógeno puede estar sustituido por una cadena alquilo de C_1 a C_{30} saturada o insaturada de tipo acetilo, o por un grupo aromático de tipo benzoilo, tosilo o benciloxicarbonilo,

35 R_2 representa el grupo hidroxilo de la función carboxilo del aminoácido C-terminal, $-OH$, en el que el átomo de hidrógeno puede estar sustituido por una cadena alquilo de C_1 a C_{30} , o un grupo NH_2 , NHY o NYY , en el que Y representa una cadena alquilo de C_1 a C_4 ,

dicha secuencia de fórmula general (I) estando constituida por 4 a 13 residuos de aminoácidos.

40 [0014] El término "compuesto peptídico" o "péptido" designa una cadena de dos o varios aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o por enlaces peptídicos modificados.

[0015] Por término "compuesto peptídico" o "péptido" debe entenderse el péptido natural o sintético de la invención como se describe anteriormente, o al menos uno de sus fragmentos, ya sea obtenido por proteólisis o sintéticamente, o incluso cualquier péptido natural o sintético

cuya secuencia está constituida total o parcialmente por la secuencia de péptido descrito anteriormente.

5 [0016] Los aminoácidos que constituyen el compuesto peptídico de la invención pueden estar en la configuración levógira, es decir, L-, y/o dextrógira, es decir, D-. El péptido de la invención puede estar en forma L-, D- o DL-.

10 [0017] Con el fin de mejorar la resistencia a la degradación, puede ser necesario utilizar una forma protegida del péptido de la invención. La forma de protección debe obviamente ser una forma biológicamente compatible y debe ser compatible con un uso en los campos de los cosméticos y productos farmacéuticos. Preferiblemente se utiliza para proteger la función amino primaria del aminoácido N-terminal, una sustitución con un grupo R_1 de tipo acilo que tiene una cadena alquilo de C_1 a C_{30} , saturada o insaturada, que puede ser seleccionada de un grupo acetilo o un grupo aromático. Preferiblemente se utiliza para proteger la función carboxilo del aminoácido C-terminal, una sustitución por un grupo R_2 de tipo cadena alquilo de C_1 a C_{30} , o un grupo NH_2 , NHY o $NY Y$ con Y representando una cadena alquilo de C_1 a C_4 .

20 [0018] El péptido de la invención puede ser protegido en el extremo N-terminal, C-terminal o en ambos extremos.

[0019] En una primera forma de realización de la invención, en la fórmula general (I), n y p son iguales a cero y la secuencia de fórmula general (I) se compone de 4 a 9 residuos de aminoácidos. Esto significa que en la fórmula general (I):

25 X_1 representa una asparagina, una serina, una glutamina o cualquier aminoácido,
 X_2 representa una serina, una treonina, una cisteína o cualquier aminoácido,
 X_3 representa una arginina, una lisina, una histidina o cualquier aminoácido,
 X_4 representa una serina, una tirosina, una treonina o cualquier aminoácido,
 X_5 representa una fenilalanina, una prolina, una alanina, una valina o cualquier
 30 aminoácido,

los números enteros n y p son iguales a cero,

35 R_1 representa la función amina primaria del aminoácido N-terminal, $-NH_2$, en la que uno de los dos átomos de hidrógeno puede estar sustituido por una cadena alquilo de C_1 a C_{30} saturada o insaturada de tipo acetilo, o por un grupo aromático de tipo benzoilo, tosilo o benciloxicarbonilo,

R_2 representa el grupo hidroxilo de la función carboxilo del aminoácido C-terminal, $-OH$, en el que el átomo de hidrógeno puede estar sustituido por una cadena alquilo de C_1 a C_{30} , o un grupo NH_2 , NHY o $NY Y$, en el que Y representa una cadena alquilo de C_1 a C_4 ,

40 dicha secuencia de fórmula general (I) estando constituida por 4 a 13 residuos de aminoácidos.

[0020] En una segunda forma de realización preferida, el compuesto peptídico corresponde a una de las fórmulas siguientes:

45 (SEC ID n°1) Ser - Cys - Arg - Asp - Leu - Lys - Lys - Thr - NH_2

(SEC ID n°2) Asn - Ser - Ser - Lys - Asp - Leu - Lys - Lys - Phe - Val - Ala
 (SEC ID n°3) Cys - Lys - Asp - Leu - Lys - Lys - Ser - Phe
 (SEC ID n°4) Gln - Thr - Arg - Asp - Leu - Lys - Lys - Ser - Pro - Lys - Val- NH₂
 (SEC ID n°5) Asn - Lys - Asp - Leu - Lys - Lys - Pro - Met
 5 (SEC ID n°6) His - Asp - Leu - Lys - Lys - Tyr - NH₂
 (SEC ID n°7) Asp - Leu - Lys - Lys - NH₂

[0021] La invención también se refiere a formas homólogas de esas secuencias. El término "homólogo" designa, de acuerdo con la invención, cualquier secuencia peptídica idéntica a al menos 50%, o preferiblemente al menos 80%, e incluso más preferiblemente al menos 90% de dicha secuencia peptídica, seleccionada de entre SEC ID N° 1 a SEC ID N° 7. Por "secuencia peptídica idéntica a al menos X %" se quiere designar un porcentaje de identidad entre los residuos de aminoácidos de las dos secuencias a comparar, obtenido después de la alineación óptima de las dos secuencias. Se obtiene la alineación óptima usando algoritmos de homologías locales tales como los utilizados por el programa de ordenador BLAST P disponible en NCBI.

[0022] El término "homólogo" también puede referirse a un péptido que difiere de la secuencia de un péptido de secuencia SEC ID n.º 1 a SEC ID N° 7 por la sustitución de aminoácidos químicamente equivalentes, es decir por la sustitución de un residuo por otro que posee las mismas características. Por lo tanto, las sustituciones clásicas tienen lugar entre Ala, Val, Leu e Ile; entre Ser y Thr; entre los residuos ácidos Asp y Glu; entre Asn y Gln; y entre los residuos básicos Lys y Arg; o entre los residuos aromáticos Phe y Tyr.

[0023] El péptido de fórmula general (I) según la invención se puede conseguir mediante síntesis química convencional (en fase sólida o en fase líquida homogénea), o por síntesis enzimática (Kullmann et al., J. Biol. Chem. 1980; 225: 8234) a partir de aminoácidos constituyentes o sus derivados.

[0024] El péptido de la invención puede ser de origen natural o sintético. Preferentemente según la invención, el péptido se obtiene por síntesis química.

[0025] Por último, el principio activo puede ser un péptido único, una mezcla de péptidos o de derivados peptídicos y/o constituido por derivados de aminoácidos.

[0026] El compuesto peptídico de la invención se puede usar como un medicamento.

[0027] De acuerdo con una realización ventajosa de la invención, el compuesto peptídico de la invención está disuelto en uno o más disolventes fisiológicamente aceptables, clásicamente usados por los expertos en la técnica, tales como agua, glicerol, etanol, propanodiol, butilenglicol, dipropilenglicol, diglicoles etoxilados o propoxilados, polioles cíclicos, o cualquier mezcla de esos disolventes.

[0028] Según otra forma de realización ventajosa de la invención, el compuesto peptídico de la invención se solubiliza en un vector cosmético o farmacéutico como los liposomas o es adsorbido sobre polímeros orgánicos pulverulentos, soportes minerales como talcos y

bentonitas, y más generalmente solubilizado en, o fijado sobre, cualquier vehículo fisiológicamente adaptado.

5 [0029] El segundo objeto de la presente invención se refiere a una composición cosmética que comprende como principio activo dicho compuesto péptido de fórmula general (I). Preferiblemente, las composiciones según la invención están en una forma adecuada para aplicación tópica que comprende un medio cosméticamente aceptable. "Cosméticamente aceptable" significa medios que son adecuados para uso en contacto con la piel o tegumentos humanos, sin riesgo de toxicidad, incompatibilidad, inestabilidad, respuesta alérgica, y otros.
10 Las composiciones para aplicación a la piel pueden estar en forma de crema, emulsión de aceite-en-agua, o agua-en-aceite o emulsión múltiple, solución, suspensión, microemulsión, gel acuoso o anhidro, suero, o incluso dispersión de vesículas, parche, aerosol, ungüento, pomada, loción, coloide, leche, loción, barra o incluso polvo, todos adecuados para aplicación sobre la piel, labios y/o tegumentos.

15 [0030] Preferiblemente, dicho compuesto peptídico está presente en la composición en una concentración comprendida entre 0,0005 y aproximadamente 500 ppm, y preferiblemente a una concentración entre 0,01 y 5 ppm.

20 [0031] Aún más preferiblemente, la composición según la invención contiene, además, al menos otro principio activo. Se puede citar, sin limitación, las clases de ingredientes siguientes: otros agentes activos peptídicos, extractos de plantas, agentes cicatrizantes, anti-envejecimiento, anti-arrugas, calmantes, anti-radicales, anti-UV, agentes hidratantes, anti-inflamatorios, anestésicos, agentes moduladores de la diferenciación, la pigmentación o la despigmentación cutánea, etc.
25

[0032] En una realización más particular, la composición según la invención comprenderá, además del compuesto peptídico de fórmula (I):

- 30
- un (o varios) compuesto activador del citocromo c, y/o;
 - un (o varios) compuesto activador de las acuaporinas y/o;
 - un (o varios) compuesto activador de las sirtuinas y/o;
 - un (o varios) compuesto que aumenta la adhesión celular y/o;
 - un (o varios) compuesto que aumenta la producción de proteínas matriciales tipo
35 colágeno, laminina etc.;
 - un (o varios) compuesto modulador de las proteínas hsp;
 - un (o varios) compuesto que aumenta la energía celular;
 - un (o varios) compuesto modulador de la pigmentación como un extracto peptídico de
40 levadura, de amaranto, de lino, de alubia, de cacao, de maíz, de soja, de girasol, de colza o de guisantes;
 - un (o varios) compuesto que mejora la función barrera de la piel;
 - un (o varios) compuesto protector de la mitocondria.

45 [0033] Dichos compuestos anteriores pueden ser naturales, como hidrolizados peptídicos de vegetales, o incluso de origen sintético, como compuestos peptídicos.

5 [0034] Además, pueden añadirse a la composición aditivos tales como disolventes, diluyentes, colorantes, filtros solares, agentes autobronceadores, pigmentos, cargas, conservantes, absorbentes de olor, espesantes, emulsionantes, humectantes, emolientes, fragancias, antioxidantes, agentes formadores de película, agentes quelantes, agentes secuestrantes, acondicionadores.

10 [0035] En todos los casos, el experto se asegurará de que estos adyuvantes y sus proporciones se elijan de manera que no perjudiquen las propiedades ventajosas buscadas de la composición según la invención. Estos adyuvantes pueden estar comprendidos, por ejemplo, entre 0,01 y 20% del peso total de la composición. Cuando la composición de la invención es una emulsión, la fase grasa puede representar de 5 a 80% en peso, y preferiblemente de 5 a 50% en peso respecto al peso total de la composición. Los emulsionantes y co-emulsionantes utilizados en la composición serán seleccionados entre los utilizados clásicamente en la materia. Por ejemplo, se pueden utilizar en una proporción que va de 0,3 a 30% en peso respecto al peso total de la composición.

20 [0036] Un tercer objeto de la invención se refiere al uso de una composición cosmética que comprende dicho compuesto peptídico en un medio cosméticamente aceptable, para proteger las estructuras pigmentarias la piel frente a las agresiones externas. Por "estructuras pigmentarias" se entiende los melanocitos y queratinocitos que tienen contacto entre sí y que forman una unidad epidérmica (o elemental) de melanización (más exactamente un melanocito por 36 queratinocitos de promedio).

25 [0037] Por "agresión externa" se entiende las agresiones producidas por el ambiente. A título de ejemplo, se pueden citar agresiones como la contaminación, la radiación UV, agresiones que causan estrés oxidativo, o los productos irritantes tales como los tensioactivos, conservantes o perfumes, las agresiones mecánicas, tales como abrasiones, afeitado o depilación. Sin embargo, preferiblemente, las agresiones externas están constituidas principalmente por la radiación UV, especialmente los UVB y las agresiones que inducen estrés oxidativo.

35 [0038] Otro uso del péptido de la invención es para reducir los defectos de pigmentación relacionados con la edad y los efectos del fotoenvejecimiento en la piel. El término "fotoenvejecimiento" se refiere a un envejecimiento prematuro de la piel causado por la exposición prolongada y acumulativa al sol. Por "defectos de pigmentación relacionados con la edad" se entiende manchas seniles, lentigos solares, manchas de despigmentación de tareas o incluso pecas. Para este propósito, el péptido de la invención puede ser utilizado para tratar las irregularidades de tono y unificar tono

40 [0039] Por último, otro objeto de la presente invención se refiere a un procedimiento de tratamiento cosmético caracterizado por la aplicación, por la mañana y por la noche sobre la piel de una composición que comprende el péptido de la invención para atenuar defectos de pigmentación relacionados con la edad y los efectos del fotoenvejecimiento en la piel. Una primera forma de realización consiste en la aplicación de dicha composición, ya sea como

cuidado antes de la exposición al sol, o como cuidado para después de la exposición al sol, para (i) prevenir y/o reparar los daños de la radiación UV sobre las células de la piel y (ii) para limitar la aparición de manchas de hiperpigmentación.

5 [0040] Los siguientes ejemplos describen y demuestran la eficacia de los compuestos peptídicos como se han descrito de acuerdo con la invención, pero no deben interpretarse como una limitación de la presente invención.

10 [0041] La Figura 1 muestra los resultados, en forma de histogramas, de una cuantificación de la intensidad de la melanina presente en biopsias de piel humana tratadas o no usando un compuesto peptídico según la invención y un inhibidor de la vía de señalización SCF/c-Kit.

15 [0042] Las figuras 2a y 2b son histogramas que muestran los resultados de dos ensayos de cometas llevados a cabo sobre queratinocitos humanos normales (NHK) y melanocitos epidérmicos humanos normales (NHEM) expuestos a radiaciones UVB y tratados o no con ayuda de un compuesto peptídico según la invención.

Ejemplo 1: Fontana-Masson en biopsias de piel humana tratadas o no con el compuesto peptídico de SEC ID N° 6 a 1% y un inhibidor de c-Kit

20 [0043] Biopsias tomadas de muestras de piel humana se cultivan en la interfase aire/líquido. Las biopsias son entonces mantenidas en cultivo durante 48 horas, tratadas o no con el compuesto peptídico SEC ID N° 6 a 1%, a razón de tres aplicaciones por día y tratadas o no con un inhibidor específico de la actividad de c-Kit, imatinib, a una concentración de 20 μ M a razón de una aplicación diaria.

25 [0044] Las biopsias se fijan luego en formaldehído y luego se incluyen en parafina. Se hacen entonces cortes de 4 mm y se depositan en láminas *Superfrost Plus* (Thermo Scientific). La tinción de melanina en los cortes se realiza utilizando una solución de nitrato de plata al 10% calentada a 60°C y revelada por adición de solución de tiosulfato de sodio al 5%. Las secciones
30 de piel se examinan bajo un microscopio en el rango visible (microscopio Nikon Eclipse E600).

Resultados :

[0045] El conjunto de los resultados se presenta en la figura 1.

5 [0046] La intensidad de la melanina en píxeles/mm se midió en cuatro condiciones: control, con el activo, con imatinib, y con el activo y el imatinib. Cuando se añade el activo al medio de cultivo sin inhibidor, se observa un aumento en la intensidad de la melanina que pasa de 53 a 142 píxeles/mm en comparación con la condición control. Se observa así el efecto del activo sobre la intensidad de la melanina.

10 [0047] Cuando se añade inhibidor de c-Kit al medio (sin activo), se observa una caída de la intensidad de melanina pasando de 53 píxeles/mm en condición de control a 44 píxeles/mm. Esto confirma así el efecto inhibidor del imatinib sobre la cantidad presente de melanina. Cuando se añade el imatinib en el medio de cultivo en presencia del activo peptídico, se constata que el efecto inhibidor del imatinib se invierte por el efecto activador del compuesto según la invención, sobre el canal de señalización c -Kit. La intensidad de la melanina pasa de
15 44 píxeles/mm en condición con el imatinib solo, a 82 píxeles/mm en condición con el compuesto peptídico y el imatinib.

Conclusiones :

20 [0048] Se observa que después de 48 horas de tratamiento, el compuesto peptídico SEC ID N° 6 induce un aumento en el contenido de melanina en la capa basal de la epidermis y permite invertir el efecto despigmentante inducida por el imatinib, lo que sugiere así una acción específica del péptido activo sobre la vía de señalización que implica c-Kit. Los efectos del compuesto peptídico de la invención pueden así contribuir a una mejor protección de la capa basal de la epidermis.

25 **Ejemplo 2: Estudio de microarrays de la expresión de una selección de genes en células NHK tratadas o no con el compuesto peptídico SEC ID N° 3 al 1%**

[0049] Queratinocitos humanos normales (o NHK) o se cultivan durante 48 horas y se tratan con el compuesto peptídico de SEC ID N° 3 a una concentración de 1%. También se realiza una condición de control sin ingrediente activo.

30 [0050] Las células se separan a continuación de su soporte con ayuda de tripsina, después se centrifugan a 1500 rpm durante 10 minutos para concentrarlas. Las células se resuspendieron en PBS 1X y 8 volúmenes de PreProtect (Miltenyi Biotec) para estabilizar los ARNs. Los ARNs totales se extrajeron entonces y se amplificaron utilizando el kit mMACS Onestep T7 Templates (Miltenyi Biotec). El ARN son transcritos inversamente y etiquetados con los fluorocromos Cy5 y Cy3. Los ADNc fluorescentes obtenidos de este modo se hibridan en portaobjetos, sobre los
35 que se depositan, por cuadruplicado, genes expresados en la piel (PIQOR™ Skin Microarray). Esto permite obtener el patrón de expresión de esos genes en células NHK tratadas o no con el compuesto peptídico de la invención. Los datos presentados se obtienen de una sola muestra agrupada (n = 1). Una ratio mayor que 1,48 indica una regulación positiva y una ratio más baja que 0,58 muestra una regulación negativa. La caracterización de la función de los genes se
40 realiza utilizando software en línea DAVID Bioinformatics Resources ("Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery").

Resultados :

45 [0051] Los resultados se presentan en la Tabla 1 inferior.

Tabla 1: Resultados de un experimento de microarray de la expresión de una selección de genes en los rasgos sobre NHK tratados con la SEC ID N° 3 comprendía 1% versus NHK no tratados

Genes Ratios	Genes Ratios
Reparación y Síntesis ADN:	Matriz extracelular y barrera cutánea:
OGG1 OXOGUANINE DNA GLYCOSYLASE 1.86	SPARC SECRETED PROTEIN ACIDIC AND RICH IN CYSTEINE 0.20
MUTYH A/G-SPECIFICADENINE 2.74 DNA GLYCOSYLASE	TIMP2 METALLOPROTEINASE INHIBITOR 2 PRECURSOR 0.55
RAD17 CELL CYCLE 2.02 CHECKPOINT PROTEIN RAD17	LAMA5 LAMININ ALPHA 5 CHAIN 2.45
RAD54L DNA REPAIR AND RECOMBINATION PROTEIN RAD54-LIKE 2.93	MMP2 MATRIX METALLOPROTEINASE-2 1.85
XPA DNA REPAIR PROTEIN COMPLEMENTING XP-A CELLS 1.48	KRT19 KERATIN, TYPE I CYTOSKELETAL 19 1.57
ERCC2 DNA EXCISION REPAIR PROTEIN ERGC-2 3.85	GLUL GLUTAMINE SYNTHETASE 1.78
ERCC5 DNA REPAIR PROTEIN COMPLEMENTING XP-G CELLS 1.52	TGM1 TRANSGLUTAMINASE 1 1.74
DDB2 DNA DAMAGE BINDING PROTEIN 2 1.74	Señal transducción y fosforilación de proteína:
TK1 THYMIDINE KINASE, CYTOSOLIC 1,92	EGFR_3 EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR PRECURSOR 1.56
POLB DNA POLYMERASE BETA 1.60	EGR1 EARLY GROWTH RESPONSE PROTEIN 1 1.68
POLD1 DNA POLYMERASE DELTA CATALYTIC CHAIN 2.65	PRKCG PROTEIN KINASE C, GAMMA TYPE 1.84
POLD4 DNA POLYMERASE DELTA SUBUNIT 4 2,42	PRKDC DNA-DEPENDENT PROTEIN KINASE CATALYTIC SUBUNIT 2.57
TYMS THYMIDYLATE SYNTHASE 1,77	PTK6 PROTEIN TYROSINE KINASE 6 1.74
	MAP2K2 MAP KINASE KINASE 2 1.62

Funciones inmunológicas:			Control de muerte celular:		
IL128	<i>INTERLEUKIN-12 BETA CHAIN PRECURSOR</i>	0.16	BCL10	<i>B CELL</i>	
IL13	<i>INTERLEUKIN-13 PRECURSOR</i>	0.20	0.28	<i>LYMPHOMA/LEUKEMIA 10</i>	
IL16	<i>INTERLEUKIN-16 PRECURSOR</i>	0.21	BCL2L2	<i>BCL-2-LIKE 2 PROTEIN</i>	
IL17A	<i>INTERLEUKIN-17 PRECURSOR</i>	0.07	3.09	DAD1	<i>DEFENDER AGAINST CELL DEATH1</i> 1.85
IL1A	<i>INTERLEUKIN-1 ALPHA PRECURSOR</i>	0.52			
IL3	<i>INTERLEUKIN-3 PRECURSOR</i>	0.08	Estrés oxidativo:		
IL5	<i>INTERLEUKIN-5 PRECURSOR</i>	0.12	CAT	<i>CATALASE</i>	1,80
IL9	<i>INTERLEUKIN-9 PRECURSOR</i>	0.28			

Conclusiones :

5 [0052] Se observa que ciertos genes implicados en el refuerzo de la barrera cutánea son modulados. Se observa igualmente una regulación hacia arriba de los genes implicados en la transducción de las señales. Por último, la expresión del gen de la catalasa está aumentada, lo que sugiere así un efecto protector contra los estreses oxidativos.

10 **Ejemplo 3 : Inmunomarcado de la expresión de la catalasa en biopsias de piel humana tratadas o no con el compuesto peptídico SEC ID n°7**

15 [0053] Con el fin de confirmar los resultados obtenidos durante el ensayo de microarray del gen de la catalasa, se llevó a cabo un inmunomarcado de ésta en presencia o no de un péptido de la invención.

20 [0054] Para ello, biopsias de muestras de piel humana se cultivan en la interfaz aire/líquido. Las biopsias son entonces mantenidas en cultivo y se tratan o no con el compuesto peptídico SEC ID N° 7 en concentraciones de 1 y 3 %. Estas biopsias son a continuación fijadas en formaldehído y luego incluidas en parafina. Secciones de 4 mm se hacen y se colocan en portaobjetos de polilisina (Thermo Scientific). A continuación, la inmunomarcación se lleva a cabo utilizando un anticuerpo primario policlonal de conejo, y específico de la catalasa (Calbiochem) y luego un anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a un fluoróforo (Invitrogen). Las secciones de piel se examinan entonces al microscopio con Epi-fluorescencia (microscopio Nikon Eclipse E600)

25

Resultados / conclusiones:

5 **[0055]** Se observa que el péptido SEC ID N° 7 de acuerdo con la invención no sólo aumenta la expresión del gen de la catalasa, sino también la expresión de la proteína correspondiente en la piel, proteína que es esencial en la protección contra el estrés oxidativo. Por lo tanto, se puede concluir que el péptido SEC ID N° 7 tiene un efecto en la protección de células de la piel contra el estrés oxidativo.

10 **Ejemplo 4 : Test de cometas sobre células NHK y NHEM trtadas con el compuesto peptídico avec le composé peptidique SEC ID n°7 a 1 % e irradiadas con rayos UVB**

15 **[0056]** Con el fin de constatar el efecto protector de los péptidos de la invención en las células NHK y NHEM y confirmar los resultados obtenidos por microarray, se lleva a cabo un ensayo de cometas sometiendo dichas células a rayos UVB.

20 **[0057]** Para ello, se cultivan NHK y NHEM durante 24 horas en la presencia del compuesto peptídico SEC ID N° 7 a una concentración de 1%, y luego se irradian con radiación UVB a razón de 30 mJ/cm² para las NHEM y 60 mJ/cm² para las NHK. Se realiza igualmente una condición de control sin activo peptídico. Las células a continuación se separan de su soporte con ayuda de tripsina, y luego se centrifugan a 900 rpm/min durante 5 minutos con el fin de concentrarlas y contarlas.

25 **[0058]** Un número definido de células (25000 células) se incluye a continuación en un gel de agarosa Low Melting a 0,75%, y después se deposita sobre una placa de vidrio previamente recubierta con 1% de agarosa. Los portaobjetos se sumergen después en una solución de lisis durante 1 h 30 min a 4°C y luego en una solución alcalina durante 20 minutos a 4°C. Así las células se lisan el ADN se desnaturaliza. Los portaobjetos se sumergen en una solución de electroforesis antes de aplicar un campo eléctrico (20 V - 250 mA). El ADN así desnaturalizado se somete a una migración dentro del gel de agarosa a 4°C. La aplicación de un colorante fluorescente del ADN en los portaobjetos (yoduro de propidio a 2 mg/ml) permite observar al microscopio el ADN que aparece en forma de cometas en el caso en que aparecen se haya dañado.

35 **[0059]** Finalmente, un software de cuantificación permite determinar el Tail Moment medio aplicado a cada condición ensayada. Este parámetro proporciona información sobre el nivel de daño del ADN: cuanto mayor es, más importantes son los daños en el ADN.

Resultados :

40 **[0060]** Los resultados se presentan en las figuras 2a et 2b. La figura 2a presenta el Tail Moment de un test de cometas realizado sobre células NHK. La figura 2b presenta el Tail Moment de un test de cometas realizado sobre células NHEM.

45 **[0061]** Para los NHK, se observa que, en presencia de UVB, el Tail Moment es muy alto (170,27 contra 1,66 en control). Esto demuestra los efectos nocivos de la radiación UVB sobre el ADN de la célula. Se observa un resultado similar en células NHEM. Por el contrario, cuando

el péptido SEC ID N° 7 se aplica en pretratamiento sobre las células antes del tratamiento con radiación UVB, se observa una disminución de Tail Moment en NHK pasando de 170.27 en la condición UVB a 51,36 en condición activo + UVB, o sea una disminución de 70%. Una disminución de 55% se constata en las células NHEM.

5

Conclusiones :

[0062] Los resultados de estos ensayos de cometas confirman los obtenidos en el test de microarray. El compuesto peptídico SEC ID n°7 a permitido tener una acción protectora sobre el ADN de las células y, de manera general, una acción protectora contra el estrés oxidativo.

10

Ejemplo 5 : Composición de una crema solar

[0063]

15

Nombres comerciales	Normas INCI	% másico
FASE A		
Agua desmineralizada	Aqua (Water)	qsp
Pemulen TR1	Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer	0,40
Glicerina	Glycerin	3,00
Nipagin M	Sodium Methylparaben	0,3
FASE B		
Parsol MCX	Ethylhexyl Methoxycinnmate	7,50
Eusolex 4360	Benzophenone-3	3,00
Parsol 1789	Butyl Methoxydibenzoylmethane	2,00
Myritol 318	Caprylic/Capric Triglyceride	4,00
Emulgade SEV	Hydrogenated Palm Glycerides (and) Ceteareth-20 (and) Ceteareth-12 (and) Cetearyl Alcohol	5,00
Phenoxetol	Phenoxyethanol	0,5
Nacol 16-98	Cetyl Alcohol	1,00
FASE C		
TEA	Triethanolamine	0,20
FASE D		
Péptido SEC ID n°4		3 ppm
Perfume	Parfum (Fragrance)	qsp
Colorante		qsp

LISTADO DE SECUENCIAS

[0064]

20

<110> ISP Investments Inc

<120> NUEVOS PÉPTIDOS QUE INTERVIENEN EN LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN SCF C-KIT Y COMPOSICIONES QUE LOS COMPRENDEN

5 <130> Bv PCT 11-149
 <150> FR1100299
 <151> 2011-02-01
 <160> 7
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 8
 <212> PRT
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 15 <223> AMIDACIÓN
 <400> 1
 Ser Cys Arg Asp Leu Lys Lys Thr
 1 5

20 <210> 2
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 25 <400> 2
 Asn Ser Ser Lys Asp Leu Lys Lys Phe Val Ala
 1 5 10

30 <210> 3
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 3
 35 **Cys Lys Asp Leu Lys Lys Ser Phe**
 1 5

40 <210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <220>
 <221> MOD_RES
 45 <222> (11)..(11)
 <223> AMIDACIÓN
 <400> 4

Gln Thr Arg Asp Leu Lys Lys Ser Pro Lys Val
 1 5 10

5
 <210> 5
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 5

10 Asn Lys Asp Leu Lys Lys Pro Met
 1 5

15
 <210> 6
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético

20
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> AMIDACIÓN
 <400> 6

25 His Asp Leu Lys Lys Tyr
 1 5

30
 <210> 7
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético

35
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> AMIDACIÓN
 <400> 7

Asp Leu Lys Lys
 1

REIVINDICACIONES

1. Compuesto peptídico de fórmula general siguiente (I):

5 R₁- (AA)_n- X₁- X₂- X₃-Asp - Leu - Lys - Lys - X₄ - X₅ - (AA)_p - R₂

en la cual,

- 10 X₁ representa una asparagina, una serina, una glutamina o cualquier aminoácido,
 X₂ representa una serina, una treonina, una cisteína o cualquier aminoácido,
 X₃ representa una arginina, una lisina, una histidina o cualquier aminoácido,
 X₄ representa una serina, una tirosina, una treonina o cualquier aminoácido,
 X₅ representa una fenilalanina, una prolina, una alanina, una valina o cualquier aminoácido,
 15 AA representa un aminoácido cualquiera, y n y p son números enteros entre 0 y 2,
 R₁ representa la función amina primaria del aminoácido N-terminal, -NH₂, en la que uno de los dos átomos de hidrógeno puede estar sustituido por una cadena alquilo de C₁ a C₃₀ saturada o insaturada de tipo acetilo, o por un grupo aromático de tipo benzoilo, tosilo o benciloxycarbonilo,
 20 R₂ representa el grupo hidroxilo de la función carboxilo del aminoácido C-terminal, - OH, en el que el átomo de hidrógeno puede estar sustituido por una cadena alquilo de C₁ a C₃₀, o un grupo NH₂, NHY o NY Y, en el que Y representa una cadena alquilo de C₁ a C₄,

- 25 dicha secuencia de fórmula general (I) estando constituida por 4 a 13 residuos de aminoácidos, **caracterizada porque** corresponde a una de las fórmulas siguientes:

- 30 (SEC ID n°1) Ser - Cys - Arg - Asp - Leu - Lys - Lys - Thr - NH₂
 (SEC ID n°2) Asn - Ser - Ser - Lys - Asp - Leu - Lys - Lys - Phe - Val - Ala - NH₂
 (SEC ID n°3) Cys - Lys - Asp - Leu - Lys - Lys - Ser - Phe
 (SEC ID n°4) Gln - Thr - Arg - Asp - Leu - Lys - Lys - Ser - Pro - Lys - Val- NH₂
 (SEC ID n°5) Asn - Lys - Asp - Leu - Lys - Lys - Pro - Met
 (SEC ID n°6) His - Asp - Leu - Lys - Lys - Tyr - NH₂
 (SEC ID n°7) Asp - Leu - Lys - Lys - NH₂

- 35
2. Un compuesto peptídico de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** está solubilizado en uno o varios disolventes fisiológicamente aceptables, como agua, glicerol, etanol, propanodiol, butilenglicol, dipropilenglicol, diglicoles etoxilados o propoxilados, polioles cíclicos, o cualquier mezcla de estos disolventes.
- 40
3. Composición cosmética que comprende a título de principio activo dicho compuesto peptídico según una de las reivindicaciones 1 o 2.
- 45
4. Composición cosmética según la reivindicación 3, **caracterizada porque** se presenta en una forma adaptada para aplicación por vía tópica que comprende un medio cosméticamente aceptable.

5. Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 3 o 4, **caracterizada porque** dicho compuesto peptídico está presente en la composición en una concentración comprendida entre aproximadamente 0,0005 y 500 ppm, y preferiblemente en una concentración entre 0,01 y 5 ppm.
6. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, **caracterizada porque** contiene, además, al menos otro principio activo.
7. Composición según la reivindicación 6, **caracterizada porque** dicho principio activo se selecciona entre hidrolizados peptídicos derivados de plantas, otros compuestos peptídicos, filtros solares, agentes anti-radicales, o incluso agentes anti-arrugas.
8. Utilización cosmética de una composición que comprende un compuesto peptídico de fórmula general siguiente (I) :
- $$R_1- (AA)_n- X_1- X_2- X_3 -Asp - Leu - Lys - Lys - X_4 - X_5 - (AA)_p - R_2$$
- en la cual,
- X_1 representa una asparagina, una serina, una glutamina o cualquier aminoácido,
 X_2 representa una serina, una treonina, una cisteína o cualquier aminoácido,
 X_3 representa una arginina, una lisina, una histidina o cualquier aminoácido,
 X_4 representa una serina, una tirosina, una treonina o cualquier aminoácido,
 X_5 representa una fenilalanina, una prolina, una alanina, una valina o cualquier aminoácido,
- AA representa un aminoácido cualquiera, y n y p son números enteros entre 0 y 2,
 R_1 representa la función amina primaria del aminoácido N-terminal, $-NH_2$, en la que uno de los dos átomos de hidrógeno puede estar sustituido por una cadena alquilo de C_1 a C_{30} saturada o insaturada de tipo acetilo, o por un grupo aromático de tipo benzoilo, tosilo o benciloxicarbonilo,
- R_2 representa el grupo hidroxilo de la función carboxilo del aminoácido C-terminal, $-OH$, en el que el átomo de hidrógeno puede estar sustituido por una cadena alquilo de C_1 a C_{30} , o un grupo NH_2 , NHY o NYY , en el que Y representa una cadena alquilo de C_1 a C_4 ,
- dicha secuencia de fórmula general (I) estando constituida por 4 a 13 residuos de aminoácidos y un medio cosméticamente aceptable para proteger las estructuras pigmentarias de la piel frente a agresiones exteriores.
9. Utilización según la reivindicación 8 **caracterizada porque** las agresiones exteriores son los rayos UV.
10. Utilización según la reivindicación 8 para atenuar los defectos de pigmentación relacionados con la edad y los efectos del fotoenvejecimiento en la piel.

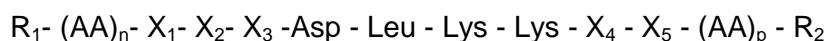
45

11. Utilización de acuerdo con la reivindicación anterior **caracterizada porque** los defectos de pigmentación asociados con la edad son manchas seniles, lentigos solares, manchas de despigmentación o incluso pecas.

5 12. Utilización según la reivindicación 8 para tratar irregularidades de tono y unificar el tono.

13. Procedimiento de tratamiento cosmético, **caracterizado porque** se aplica, por la mañana y por la noche sobre la piel, una composición que comprende una cantidad eficaz de un compuesto peptídico de la siguiente fórmula general (I):

10



en la cual,

15 X_1 representa una asparagina, una serina, una glutamina o cualquier aminoácido,
 X_2 representa una serina, una treonina, una cisteína o cualquier aminoácido,
 X_3 representa una arginina, una lisina, una histidina o cualquier aminoácido,
 X_4 representa una serina, una tirosina, una treonina o cualquier aminoácido,
 X_5 representa una fenilalanina, una prolina, una alanina, una valina o cualquier
 20 aminoácido,

AA representa un aminoácido cualquiera, y n y p son números enteros comprendidos entre 0 y 2,

R_1 representa la función amina primaria del aminoácido N-terminal, -NH₂, en la que uno de los dos átomos de hidrógeno puede estar sustituido por una cadena alquilo de C₁ a C₃₀ saturada o insaturada de tipo acetilo, o por un grupo aromático de tipo benzilo, tosilo o benciloxicarbonilo,

25 R_2 representa el grupo hidroxilo de la función carboxilo del aminoácido C-terminal, -OH, en el que el átomo de hidrógeno puede estar sustituido por una cadena alquilo de C₁ a C₃₀, o un grupo NH₂, NHY o NY₂, en el que Y representa una cadena alquilo de C₁ a C₄,

30 dicha secuencia de fórmula general (I) estando constituida por 4 a 13 residuos de aminoácidos y un medio cosméticamente aceptable para para atenuar los defectos de pigmentación relacionados con la edad y los efectos del fotoenvejecimiento en la piel.

35 14. Procedimiento de tratamiento cosmético según la reivindicación precedente **caracterizado porque** la composición se aplica antes de una exposición al sol, como protección solar previa, o después de una exposición al sol como cuidado después del sol, para prevenir y/o reparar los daños debidos a la radiación UV sobre las células de la piel.

40 15. Procedimiento de tratamiento cosmético según la reivindicación 13 **caracterizado porque** la composición se aplica antes de una exposición al sol, como protección solar previa, o después de una exposición al sol como cuidado después del sol, para limitar la aparición de manchas de hiperpigmentación.

45

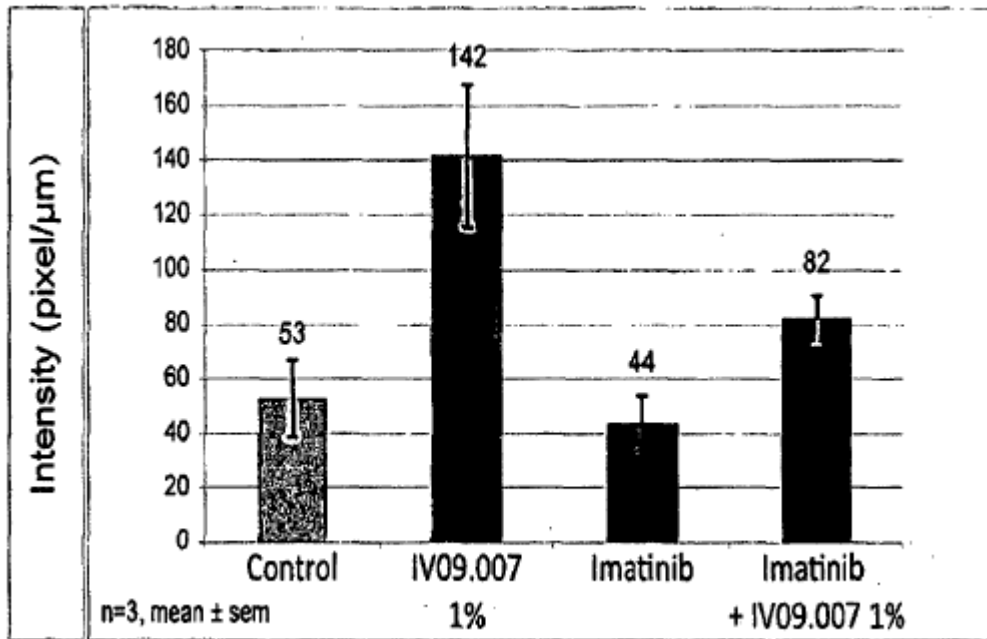


Figura 1: cuantificación del contenido en melanina de biopsias de piel tratadas con el péptido SEC ID nº 6 y del imatinib durante 48 h

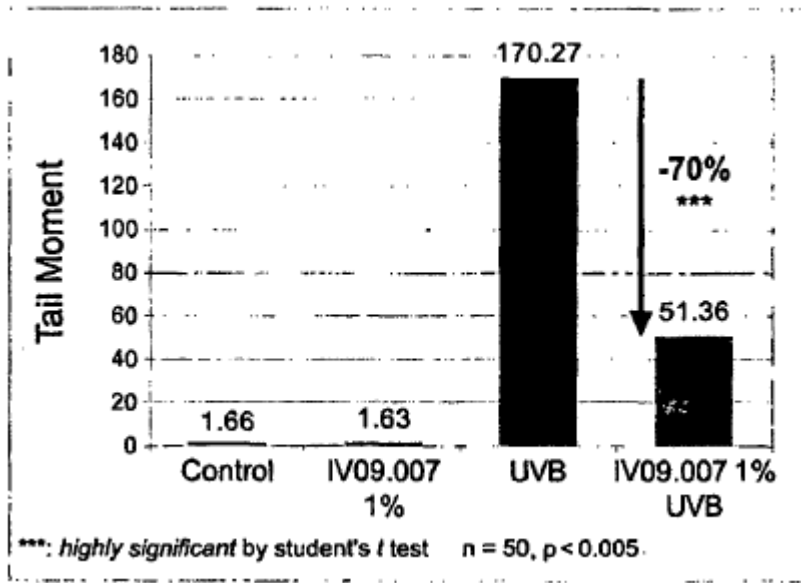


Figura 2a: Ensayo de cometas sobre NHK tratadas con el péptido SEC ID n° 7 e irradiadas con rayos UVB

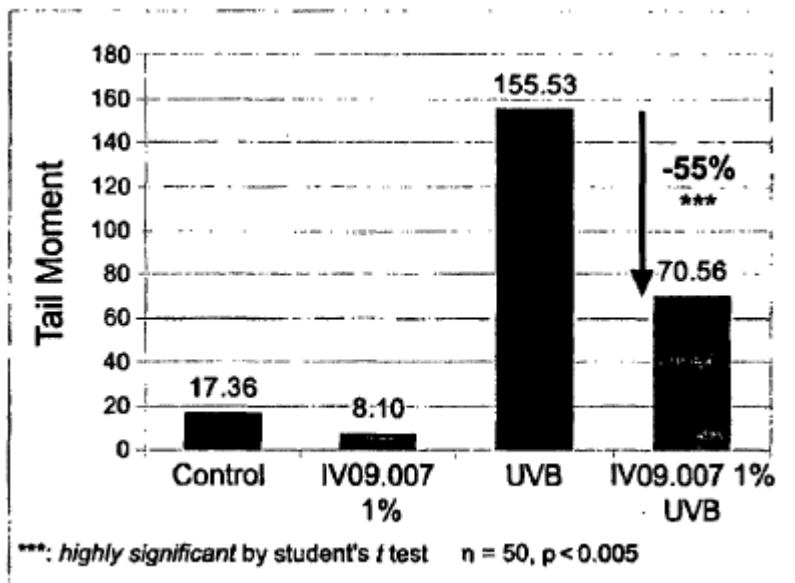


Figura 2b: Ensayo de cometas sobre NHEM tratadas con el péptido SEC ID n° 7 e irradiadas con rayos UVB